

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2001-0048881

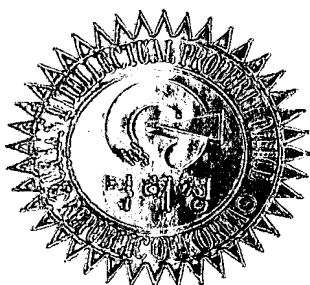
Application Number

출원 년 월 일 : 2001년 08월 14일

Date of Application AUG 14, 2001

출원인 : 한국과학기술원

Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology



2006년 06월 07일

특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.04.28
【제출인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2001-0048881
【출원일자】	2001.08.14
【심사청구일자】	2001.08.14
【발명의 명칭】	O m p F 를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외부로 분 비 생산하는 방법
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2004-0031461-27
【발송일자】	2004.01.30
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

대리인

이한영 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 3,000 원

【첨부서류】 1.보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정서】

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 1】

엠펙실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 C-말단에 단백질 분해효소가 인식하여 절단할 수 있는 부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide)와 목적 단백질 유전자를 도입시킬 수 있는 OmpF 유전자를 포함하고, 도 2의 유전자 지도를 가지는, 발현벡터 pOmpF6.

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 3】

(i) 엠펙실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함하고, 도 2의 유전자 지도를 가지는 발현벡터 pOmpF6에 존재하는 OmpF 유전자의 C-말단에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현벡터를 작제하는 공정;

(ii) 전기 재조합 발현벡터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형

질전환체를 제조하는 공정;

(iii) 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합단백질을 수득하는 공정; 및,

(iv) 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함하는, 발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2001.08.14
【발명의 국문명칭】 Omp F를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비
 생산하는 방법
【발명의 영문명칭】 A Method for Extracellular Production of Target
 Proteins Employing OmpF in E. coli
【출원인】
【명칭】 한국과학기술원
【출원인코드】 3-1998-098866-1
【대리인】
【성명】 이한영
【대리인코드】 9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】 1999-020229-3
【발명자】
【성명의 국문표기】 이상엽
【성명의 영문표기】 LEE, Sang-Yup
【주민등록번호】 640412-1025515
【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 212-702
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 정기준
【성명의 영문표기】 JEONG, Ki Jun
【주민등록번호】 700927-1481010
【우편번호】 305-335

【주소】 대전광역시 유성구 궁동 392-3 과기원 아파트 102-411
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)
【수탁번호】 KCTC 1026BP
【수탁일자】 2001.06.01
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 18
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	13 면	13,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	8 항	365,000 원
【합계】	407,000 원	
【감면사유】	정부출연연구기관	
【감면후 수수료】	203,500 원	
【첨부서류】	1. 요약서 명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통[원, 역문]	

【요약서】

【요약】

본 발명은 대장균에서 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 엠펙실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다. 본 발명에 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로, 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

OmpF, 분비생산

【명세서】

【발명의 명칭】

Omp F를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법{A Method for Extracellular Production of Target Proteins Employing OmpF in E. coli}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 나타내는 유전자 지도이다.
- <2> 도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다.
- <3> 도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다.
- <4> 도 4는 재조합 발현벡터 pEDOmpF3를 나타내는 유전자 지도이다.
- <5> 도 5는 재조합 발현벡터 pTrcOmpF4를 나타내는 유전자 지도이다.
- <6> 도 6은 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E의 제작과정 및 유전자 지도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <7> 본 발명은 대장균 세포외막 단백질 F(OmpF)를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대

장균에서 OmpF 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비 생산하는 방법에 관한 것이다.

<8>

대장균에서 목적 단백질을 세포외로 분비생산시킬 경우, 대장균 세포내에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해(proteolysis)를 근본적으로 방지할 수 있고, 분비과정을 통하여 단백질의 올바른 접힘(folding)을 유도하여 불용성 봉입체(inclusion body)의 형성을 방지할 수 있으며, 분비과정을 통하여 N-말단의 분비신호서열이 제거되기 때문에 세포내 생산시 불가피하게 연결되는 N-말단의 메티오닌(methionine, Met) 잔기를 갖고 있지 않는 자연상태에 존재하는 것과 동일한 아미노산 서열을 유지할 수 있으므로, 매우 효과적인 생산방법으로 알려져 있다. 또한, 대량생산의 측면에서 볼 때, 단백질 과잉생산에 따른 세포에 주는 부담이 훨씬 줄어들어 고농도 배양 및 연속배양을 통한 단백질 대량생산이 가능하고, 자연상태에서 대장균에서 배양액으로 분비하는 단백질은 거의 없기 때문에, 목적 단백질의 순수분리가 매우 용이하다는 장점도 있다.

<9>

이와 같이 세포외 분비생산이 갖는 장점으로 인하여, 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산에 관하여 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 지금까지 진행되어온 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산은 다음과 같이 크게 세가지로 분류할 수 있다: 첫째, 분비신호서열(signal peptide)과 목적 단백질 유전자의 융합 방법에 관한 연구인데, 토크소이(Toksoy) 등은 말토오스 결합 단백질(maltose binding protein, MBP)과 분비신호서열을 융합시켜서 *TaqI* 단백질을 세포외 분비생

산하였고, 로(Lo) 등은 고초균(*Bacillus subtilis*)에서 유래한 베타-1,4-엔도글루카나제(β -1,4-endoglucanase)를 대장균에서 발현한 결과, 세포의 분비생산이 일어나고 있음을 확인하였으며, 나가하리(Nagahari) 등은 OmpF 단백질의 분비신호서열 및 N-말단 8개 아미노산과의 융합방법을 이용하여 베타-엔돌핀을 세포의 분비생산하였고, 야마모토(Yamamoto) 등은 앞서와 같은 OmpF 분비신호서열과의 융합방법을 이용하여 하비뮤린사코마바이러스(harvey murine sarcoma virus)에서 유래한 p21 단백질의 분비생산을 시도하였으나, 분비생산되지 않고 세포질내에 불용성 응집체 형태로 축적되었다고 보고하였다(참조: Toksoy E. et al., *Biotechnology Techniques*, 13:803-808, 1999; Lo A. C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2287-2292, 1988; Nagahari et al., *EMBO J.*, 4:3589-3592, 1985; Yamamoto et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35:615-621, 1991). 둘째, 대장균에서 단백질 분비에 관여하는 단백질의 동시생산방법을 이용하는 연구가 진행되었는데, 바넥스(Baneyx) 등은 OmpA-TEM- β -락타메이즈 융합 단백질의 분비생산에 대장균의 막단백질인 TolAIII 단백질의 동시생산 방법을 이용하였고, 로빈슨(Robbens) 등은 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2)의 생산에 있어 *kil* 유전자의 동시발현방법을 사용하였으며, 반데르발(van der Wal) 등은 베타-락타메이즈의 세포의 분비생산에 대장균의 지질단백질인 박테리오신 분비 단백질(bacteriocin release protein, BRP)을 이용할 수 있음을 보고하였고, 아리스티도우(Aristidou) 등은 BRP를 이용한 세포의 분비생산에서 배지내에 글리신의 첨가가 분비효율을 높이는데 효과가 있다고 보고하였다(참조: Baneyx F. and Eugene W. M., *Protein Expr. Purif.*, 14:13-22,

1998; Robbins J. et al., Protein Expr. Purif., 6:481-486, 1995; van der Wal F. J. et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:392-398, 1998; Aristidou A. A. et al., Biotechnol. Lett., 15:331-336, 1993). 셋째, 세포외막이 없는 대장균을 이용하는 방법으로, 소위 L-형이라 불리는 이 돌연변이체는 대장균의 세포외막을 제거함으로써 주변세포질 없이 세포내막으로만 세포가 형성되어 있는 상태이므로, 기존의 널리 이용되어 왔던 주변세포질로의 단백질 분비생산 방법을 이용하였을 때 세포내막만 통과하면 주변세포질 없이 바로 세포 배양액으로 노출이 되기 때문에 세포의 분비생산이 가능하다는 점을 이용한 것인데, 쿠자우(Kujau) 등은 L-형 대장균인 RV308 균주를 사용하여 미니항체(miniantibody, miniAb)를 세포외로 분비생산하였음을 보고하였다(참조: Kujau M. J. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 49:51-58, 1998).

<10>

이와 같이 대장균에서 목적 단백질의 세포외 분비생산을 위해 다양한 방법들이 개발되어 왔으나, 아직도 여러가지 문제점들이 해결되지 않고 남아 있다. 대표적인 것이 분비되는 단백질의 부분용해현상이다. 이론상으로는, 단백질이 분비될 때 용해현상이 일어나지 않아야 하지만, 실제적으로는 세포내 단백질 분해효소에 의한 부분용해현상이 발생하고 있어, 단백질의 정제과정이 복잡해질 뿐만 아니라, 고농도 배양이 불가능하다는 단점이 대두되었다. 이를 극복하기 위하여, 여러가지 노력이 계속되고 있으며, 일부 그룹에서는 L-형의 대장균을 사용하는 방법을 적용하기도 하였으나, 외부자극에 대한 저항력이 약하고, 생활주기(life cycle)가 짧아서, 고농도 배양에 적합하지 못하다는 점이 단점으로 지적되었다.

<11> 따라서, 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<12> 이에, 본 발명자는 대장균에서 효율적으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 목적 단백질의 유전자와 대장균의 세포외막 단백질 F(OmpF)의 유전자를 포함하는 발현백터를 대장균에서 발현시킬 경우, 목적 단백질이 대장균으로부터 세포배양액으로 효율적으로 분비생산되며, 세포 배양액의 융합 단백질로부터 OmpF를 제거하고 원하는 재조합 단백질만을 쉽게 분리, 정제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<13> 결국, 본 발명의 주된 목적은 OmpF의 유전자와 목적 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 다른 목적은 전기 발현백터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 전기 형질전환체를 배양하고, 이로부터 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<16> 본 발명의 발현백터는 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다.

<17> 전기 발현백터를 이용하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 방법은 전기 발현백터에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드 (oligopeptide) 및 목적 단백질의 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현백터를 작제하는 공정; 전기 재조합 발현백터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 공정; 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합단백질을 수득하는 공정; 및, 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함한다: 이때, 단백질 분해효소로는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), 게네나제(His-Tyr 또는 Tyr-His), IgA 프로테아제(Pro/Ser-Arg/Thr-Pro-Pro-Thr/Ser/Ala-Pro), 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는 플라스민을 사용할 수 있으나, 팩터 Xa를 사용함이 바람직하고, 목적 단백질로는 펩타이드, 효소, 항체 등의 OmpF와 융합 가능한 모든 단백질을 사용할 수 있으나, 베타-엔돌핀을 사용함이 바람직하며, 숙주세포로는 특별히 제한되는 것은 아니나, 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물 또는 살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물을 사용함이 바람직하다.

<18> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<19> 본 발명자들은 재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 6개의 대장균주들 (BL21(DE3), HB101, JM101, MC4100, XL1-Blue, W3110)을 배양하고, 이로부터 세포 외막 단백질을 분획하여 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분석한 결과, 6가지 대장균주 중에 BL21(DE3)에서 OmpF 단백질이 과다 발현되고 있음을 확인하였다. 본 발명자들이 대장균 OmpF 발현시스템을 위해 제조한 재조합 발현벡터 pOmpF6는 대장균 OmpF 유전자, OmpF 프로모터 및 앰피실린 저항 유전자를 포함한다. 이때, OmpF 유전자 및 프로모터는 대장균 BL21(DE3) 염색체로부터 PCR 방법을 이용하여 수득하였다. 전기 재조합 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)이라 명명하고, 그를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

<20> 이어, 전기 재조합 발현벡터 pOmpF6를 이용한 OmpF-융합단백질의 분비생산의 일 실시예로서, 베타-엔돌핀을 대장균에서 분비생산하도록, 베타-엔돌핀을 코딩하는 cDNA, OmpF 단백질을 암호화하는 유전자, OmpF 프로모터, OmpF 단백질과 베타-엔돌핀 사이에 삽입된 팩터 Xa 인식 및 절단을 위한 4개의 아미노산으로 구성된 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 앰피실린 저항 유전자(ampicillin resistance gene)를 포함하는 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 작제하고, 이를 OmpF 유전자가 결

여된 대장균 BL21(DE3)(Novagen Co., 미국)에 도입하여, 형질전환체를 제조한 다음, 이를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질을 수득하였다. 전기 수득한 융합단백질을 음이온 교환 크로마토그래피 방법으로 1차 정제하고, 단백질 분해효소인 팩터 Xa를 처리하여 OmpF 단백질을 절단함으로써, 온전한 형태의 베타-엔돌핀을 얻을 수가 있었다.

<21> 종래의 기술에 의하여 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 경우, 대부분 대장균의 단백질분해효소에 의한 용해현상이 수반되어, 고농도 배양이 실질적으로 불가능하지만, 본 발명에 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로, 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

<22> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<23> 실시예 1: OmpF 과다발현 대장균의 선택

<24> 재조합 단백질 생산에 널리 이용되는 대표적인 6가지 대장균을 선별하여, 각각의 대장균으로부터 세포외막 단백질을 분리하고, SDS-PAGE 젤 전기영동을 수행하여 비교하여 보았다. 선별된 6가지 대장균은 대장균 BL21(DE3)[*F*⁻ *ompT* *hsdSB*(*rB*⁻ *mB*⁻) *gal* *dcm* (*DE3*) a prophage carrying the T7 RNA polymerase gene](Novagen Co., 미국), HB101[*F*⁻ *hsdS20* (*rk*⁻, *mk*⁻) *recA13* *ara-14* *proA2* *lacY1* *galK2* *rpsL20*(*str*) *xy11-5* *mtl-1* *supE44* λ -](New England Biolabs, 미국), JM101[*supE* *thi-1* Δ (*lac*-*proAB*) [*F*'*traD36* *proAB* *lacIqZ* Δ M15]](Stratagene Co., 미국), MC4100[*F*⁻ *araD139* Δ (*argF*-*lac*)*U169* *rpsL150*(*strr*) *relA1* *flbB5301* *deoC1* *ptsF25* *rbsR*](Stratagene Co., 미국), XL1-Blue[*SupE44* *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi* *relA1* *lac* *F*(*proAB*⁺ *lacIq* *lacZ*M15 *Tn10*(*tetr*)](Stratagene Co., 미국) 및 W3110[derived from K-12, λ -, *F*⁻, prototrophic](KCTC 2223)으로서 각각을 250mL 플라스크에서 배양하였으며, 배양온도는 37℃, 사용한 배지는 50mL LB 배지(트립톤 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L)를 사용하였다.

<25> 각각의 배양물로 부터 균주를 회수한 다음, 각 대장균의 세포 외막단백질을 다음과 같은 방법으로 분획하였다: 배양액 3mL를 4℃에서 3500 x g로 5분동안 원심 분리하여 침전물을 수득하고, 1mL Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 한번 세척한 후에 다시 4℃에서 3500 x g로 5분 동안 원심분리하여 수득한 침전물을 Na₂HPO₄(pH 7.2)

완충용액 0.5mL에 현탁하였다. 이어, 현탁액을 초음파 처리(sonication)하여 현탁액 속의 모든 세포를 파쇄하고, 실온에서 10,000 x g로 2분동안 원심분리하여 세포 파편(debris)이 제거된 상층액을 수득하였으며, 이를 실온에서 10000 x g로 30분동안 원심분리하고, 0.5mL 0.5%(w/v) 사르코실(sarcosyl)/10M Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액에 현탁하여 세포막 단백질을 분획을 수득하였다.

<26> 전기 수득한 세포막 단백질을 37℃에서 30분동안 방치시키고, 4℃에서 10,000 x g로 30분동안 원심분리하여 불용상을 수득하고, 10mM Na₂HPO₄(pH 7.2) 완충용액으로 세척한 다음, 50μl PBS(0.274M NaCl, 0.041M Na₂HPO₄, 0.047M KH₂PO₄, 0.005M KCl, pH 7.4) 용액에 현탁하여 세포 외막 단백질 분획시료를 수득하였다(참조: Puenete, J.L. *et al.*, *Gene*, 156:1-9, 1995). 수득한 각각의 세포 외막 단백질을 분획시료 64μl를 SDS-PAGE 겔 전기영동을 수행한 결과, 대장균 BL21(DE3)에서 다량의 OmpF 단백질이 생성됨을 알 수 있었다.

<27> 실시예 2: *ompF* 유전자가 결여된 대장균의 제조

<28> 박테리오파아지 레드오페론(red operon, exo-beta-gam)을 사용하여, 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자를 제거하였다: 즉, 박테리오파아지 레드오페론을 주형으로 하고, 프라이머 1: 5'-CGCGCCATGGATATTAATACTGAACTGAGATCAAGC-3'(서열번호 1)과 프라이머 2: 5'-CGGGATCCTCATCGCCATTGCTCCCCAAATAC-3'(서열번호 2)를 이용하여,

PCR 방법을 수행한 다음, 수득한 절편을 아가로스 겔 전기영동법(agarose gel electrophoresis)으로 약 2kb 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소인 *Nco*I과 *Bam*HI으로 절단하였다. 한편, *trc* 프로모터를 갖고 있는 발현벡터 pTrc99A(Pharmacia Biotech Co., 미국)를 제한효소 *Nco*I과 *Bam*HI으로 절단하고, 전기 PCR 절편을 연결시켜서 발현벡터를 작제한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환시켰다. 이어, 형질전환된 균주를 항생제 엠피실린(ampicillin, 50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 수득하였다(참조: 도 1). 도 1은 재조합 발현벡터 pTrcEBG의 유전자 지도이다. 이어, 대장균 BL21(DE3)균주를 앞에서 수득한 pTrcEBG로 형질전환하였으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었다. 이 형질전환 균주를 500mL LB 배지에서 세포농도 O.D.₆₀₀ 0.3 까지 배양한 다음, 1mM IPTG를 배지에 첨가하여 발현벡터 pTrcEBG에 클로닝된 *exo-beta-gal* 유전자의 발현을 유도하였다. 1시간 경과 후, 세포를 원심분리하여 회수하고, 3차 증류수 250mL에 세척하였다. 회수된 세포를 10%(v/v) 글리세롤 10mL에 현탁한 다음, 다시 원심분리를 통하여 세포를 회수하여 -80℃에서 저장하였다.

<29>

한편, 대장균 BL21(DE3)로부터 수득한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3: 5'-CGGAATTCTGGATTATACCGACGCAG-3'(서열번호 3)과 프라이머 4: 5'-GCGGATCCTTAGAACTGGTAAACGATAC-3'(서열번호 4)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 2160bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단하여 pBluescript

SK(-)(Stratagene Cloning Systems, 미국)에 클로닝하고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜, 형질전환시켰으며, 이로부터 재조합 발현벡터 pOmpF6를 수득하였다(참조: 도 2). 도 2는 재조합 발현벡터 pOmpF6를 나타내는 유전자 지도이다. 또한, 발현벡터 pACYC177(New England Biolabs, 미국)을 주형으로 하고, 프라이머 5: 5'-

CGCTGCAGTTAGAAAACTCATCGAGCATC-3'(서열번호 5)과 프라이머 6: 5'-

GCCTGCAGGCCACGTTGTGTCCTCAAA-3'(서열번호 6)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 940bp의 PCR 절편을 수득하였다. 이를 *Pst*I으로 절단하여 pOmpF6에 도입시키고, 대장균 XL1-Blue에 도입시켜서 형질전환시켰으며, 이로부터 카나마이신 저항유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 수득하였다(참조: 도 3). 도 3은 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 나타내는 유전자 지도이다. 도 3에서 보듯이, 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm은 대장균 BL21(DE3)에서 유래한 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 갖고 있고, 카나마이신 저항 유전자는 *ompF* 유전자의 5' 말단과 프로모터 사이에 삽입이 되어 있어 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm에서 *ompF* 유전자의 발현은 일어날 수 없다. 전기 재조합 발현벡터 pSKOmpFKm을 주형으로 하고, 프라이머 3과 4를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 카나마이신 저항 유전자가 중간에 삽입된 *ompF* 유전자 및 그 프로모터 지역을 포함한 PCR 절편을 수득하였다. 이를 전기 pTrcEBG로 형질전환된 대장균 BL21(DE3)균주에 도입하여, 형질전환시켰으며, 형질전환 균주는 항생제 엠피실린과 카나마이신이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하였다. 선별된 재조합 균주로부터 재조합 발현벡터 pTrcEBG를 제거하기 위하여, 항생제 엠피실린이 첨가되지 않은 LB배지에서 2일동안 5회 계대배양을 수행하고, 항생제 카나마이신이

첨가된 LB 평판배지에 도말하여, 항생제 엠피실린이 첨가된 LB 평판 배지에서 성장하지 못하는 균주를 최종적으로 선별하였다. 그런 다음, 이들의 게놈 DNA를 분리하여 염색체내 *ompF* 유전자 위치에 카나마이신 유전자가 삽입이 되어있는지 여부를 PCR 방법으로 확인하였다: 즉, 전기 분리한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 3과 프라이머 8: 5'-GATCGGAATTGATTTGAGTTTCC-3'(서열번호 8)을 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과 및 동일한 주형, 프라이머 7: 5'-CCACAGCAACGGTGTCTCTG-3'(서열번호 7) 및 프라이머 9: 5'-ATCTTTATCTTTGTAGCACTTTCAC-3'(서열번호 9)를 이용하여 PCR을 수행하고, 이로부터 얻어진 절편의 분석결과를 통하여 카나마이신 유전자가 대장균 BL21(DE3)의 *ompF* 유전자 위치에 삽입이 되었음을 확인하고, 전기 형질전환 균주를 "대장균 BL101"이라 명명하였다.

<30> 실시에 3: *ompF* 유전자 발현시스템의 개발

<31> 실시예 2의 재조합 대장균 대장균 BL101에서 OmpF 단백질을 발현하기 위하여 세가지의 재조합 플라스미드를 제작하였다.

<32> 첫째, 강력한 유도발현 프로모터인 T7 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현 벡터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 10: 5'-GCGAATTCATATGATGAAGCGCAATATTCTG-3'(서열번호 10)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 발현

백터 pET21c(Novagen, 미국)에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현백터 pEDOmpF3를 수득하였다(참조: 도 4). 도 4는 재조합 발현백터 pEDOmpF3의 유전자 지도이다.

<33> 둘째, 유도발현 프로모터인 Trc 프로모터를 이용한 *ompF* 유전자 발현백터를 제작하기 위하여, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 4와 프라이머 11: 5'-GCGAATTCCATGGTGAAGCGCAATATTCTGGCAG-3'(서열번호 11)을 사용하여 PCR 반응을 수행하고, 수득한 절편을 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 발현백터 pTrc99A에 도입하여 클로닝한 다음, 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현백터 pTrcOmpF4를 수득하였다(참조: 도 5). 도 5는 재조합 발현백터 pTrcOmpF4의 유전자 지도이다.

<34> 세 번째로, OmpF 자체의 프로모터를 이용하기 위한 백터로서는 실시예 2에서 제작한 pOmpF6를 이용하였다.

<35> 세가지 재조합 발현백터(pEDOmpF3, pTrcOmpF4, pOmpF6)를 실시예 2에서 제조한 대장균 BL101 균주에 각각 도입하여 형질전환시키고, 항생제 카나마이신과 엠프실린이 첨가된 LB 평판배지에서 각각의 형질전환된 균주를 선별하였다. 이어, 각각의 발현 시스템에서 OmpF 단백질이 가장 효율적으로 분비되는 시스템을 선택하기 위하여, 선별된 각각의 재조합 대장균주를 단순배지인 50mL R/2 배지{(NH₄)₂HPO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 6.75g/L, 시트르산 0.85g/L, MgSO₄·7H₂O 0.7g/L, 5M HCL/L, FeSO₄·7H₂O 10g/L, ZnSO₄·7H₂O 2.25g/L, CuSO₄·5H₂O 1g/L, MnSO₄·5H₂O 0.5g/L, Na₂B₄O₇·10H₂O

0.23g/L, CaCl₂·2H₂O 2g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.1g/L, 포도당 10g/L}에서 37℃의 조건으로 배양하였다.

<36> 재조합 발현벡터 pEDOmpF3와 pTrcOmpF4로 형질전환된 균주의 배양액의 O.D.₆₀₀이 0.7일 때, 1mM IPTG(isopropyl-β-thiogalactoside)를 첨가하여 *ompF* 유전자의 발현을 유도하였다. 또한, 대조군으로 형질전환되지 않은 대장균 BL21(DE3)와 대장균 BL101을 동일한 조건으로 배양한 다음, 실시예 1의 방법으로 배양된 각 균주의 세포 외막단백질 분획을 수득하고 이를 전기영동한 결과, pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101에서 모균주인 대장균 BL21(DE3)에서와 비슷한 수준의 OmpF 단백질이 생성되어 세포외막에 존재하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 결과를 바탕으로 OmpF 융합 단백질 발현 시스템에 OmpF 프로모터를 이용한 방법이 가장 적합함을 알 수 있었다.

<37> 이에, 본 발명자들은 재조합 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101을 "대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)"라 명명하고, 이를 2001년 6월 1일자로 국제기탁기관인 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에 기탁번호 KCTC 1026BP로 기탁하였다.

<38> 실시예 4: OmpF-베타-엔돌핀 발현벡터의 제작

<39> 베타-엔돌핀은 31개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이를 암호화하는 유전

자는 총 93개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있다(참조: Takahashi H. et al., FEBS Lett., 135:97-102, 1981).

<40>

이를 제조하기 위하여, 프라이머 12: 5'-

ACCGCCATACCTTCCCTCGATGAACTGGTAAACGATA-3'(서열번호 12), 프라이머 13: 5'-

GGAAGGTATGGCGGTTTCATGACCAGCGAAAAAAGCCAGAC-3'(서열번호 13), 프라이머 14: 5'-

CGCGTTTTTAAACAGGGTCACCAGCGGGGTCTGGCTTTTTTCGC-3'(서열번호 14), 프라이머 15:

5'-CCCTGTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGCGTATAAAAAAG-3'(서열번호 15) 및 프라이머 16:

5'-GCGGATCCCTATTATTCGCCTTTTTTATACGCGTTTTTG-3'(서열번호 16)을 각각 합성하고,

이들을 혼합하여 PCR을 수행하였다. 또한, 대장균 BL21(DE3)의 게놈 DNA를 주형으

로 하고, 프라이머 10과 12를 이용하여 PCR을 수행하였다. 각각 수득한 PCR 절편

을 혼합하고, 프라이머 10과 16을 첨가하여 다시 PCR을 수행한 결과, *ompF* 유전자

의 말단에 팩터 Xa 인식 및 절단부위인 4개의 아미노산과 베타-엔돌핀을 암호화하

는 유전자가 융합된 PCR 절편을 수득하였다. 전기 PCR 절편을 제한효소 *Bgl*II와

*Xba*I으로 절단하고, 재조합 발현벡터 pOmpF6의 *Bgl*II와 *Xba*I 위치에 도입하여 클로

닝하였다. 그런 다음, 이를 대장균 XL1-Blue에 도입하여 재조합 발현벡터 pOmpF6

βE를 작제하였다(참조: 도 6). 도 6은 재조합 발현벡터 pOmpF6βE의 제작과정 및

유전자 지도이다. 전기 재조합 발현벡터 pOmpF6βE에서 *ompF* 유전자에 연결된 베타-

엔돌핀의 아미노산 서열은 Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr

Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu

Stop(서열번호 17)이고, 유전자 서열은 5'-

TATGGCGGTTTCATGACCAGCGAAAAAGCCAGACCCGCTGGTGACCCTGTTTAAAAACGCGATCATCAAAAACGC
GTATAAAAAAGGCGAATAA-3'(서열번호 18)이다.

<41> 전기 수득한 재조합 발현벡터 pOmpF6 β E를 대장균 BL101에 도입하여 형질전환체를 제조하고, 이를 카나마이신과 엠포실린이 첨가된 LB 평판배지에서 배양하여, 형질전환체를 선별하였다.

<42> 실시예 5: OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질의 세포외 분비 생산

<43> 실시예 4에서 제조된 형질전환체를 1.8L R/2배지에 접종하고, 37℃에서 유가식 배양방법으로 배양하였다. 이때, 공급기질액의 조성은 포도당 700g/L, MgSO₄·7H₂O 20g/L이고, 배지내 pH가 6.88이상일 때, 공급기질액이 배양액으로 10mL/min의 속도로 유입되어, 배양액내의 포도당의 농도를 0.7g/L로 유지하도록 조절하고, 배지내 용존산소량(DO)은 40%(v/v)로 유지되도록 공기 및 순수산소가 자동 조절되어 공급되었다. 배양을 진행하면서 시간의 경과에 따라, 분광광도계로 600nm 파장에서 광학밀도(O.D.)를 측정하고, 200ml씩 배양액을 추출하였다. 상기 배양을 17시간 30분 동안 수행한 결과, 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(O.D.)가 150.5이고, 세포건조 중량은 54.1g/L임을 확인하였다. 세포배양액으로 분비된 단백질을 확인하기 위하여, 시산의 경과에 따라 추출보관된 배양액을 원심분리하여 상층액을 수득하고, 상층액 10 μ l씩 취하여 전기영동을 수행한 결과, 약

40 kDa 크기의 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 세포배양액으로 분비되어 축적되고 있음을 확인하였고, 배양시간의 경과에 따라 축적되는 양은 점점 증가하여 최종적으로 세포배양액에 존재하는 전체단백질의 45%에 해당하는 4.64g/L의 융합단백질이 축적되어 있음을 알 수 있었다.

<44> 실시예 6: 세포외로 분비 생산된 베타-엔돌핀의 순수분리

<45> 실시예 5의 배양액에 축적된 OmpF-베타-엔돌핀 융합단백질로부터 베타-엔돌핀을 순수하게 분리하였다: 먼저, 음이온교환크로마토그래피 방법을 사용하였는데, 이동상으로는 50mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액을 이용하고, 음이온 교환수지로는 Q2-컬럼 (BIO-RAD Co., 미국)을 이용하였으며, 이동상의 이동속도는 1mL/min이고, 용출방법으로는 이동상에 NaCl의 농도가 0 에서 1M로 비례적으로 증가되는 경사 용리 (gradient elution) 방법을 이용하였다. 그 결과, 약 0.45M의 NaCl 농도에서 OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질이 용출되어, OmpF-베타 엔돌핀 융합단백질 89.1mg을 분리하였다. 분리된 OmpF-베타 엔돌핀 융합단백질 수용액에 함유된 NaCl은 투석방법으로 제거하고, OmpF-베타-엔돌핀 융합 단백질로부터 OmpF 단백질을 제거하기 위하여 단백질 분해효소인 팩터 Xa를 1:200(w/w) 비율로 융합단백질과 혼합한 다음, 23℃에서 12시간동안 반응시켰다. 이어, 베타-엔돌핀을 순수분리하기 위하여 역상 HPLC(reverse phase high performance liquid chromatography) 방법을 사용하였는

데, HPLC 컬럼으로는 Microsorb-MV C₁₈ 컬럼(4.6 x 250 mm, Varian, 미국)을 사용하
고, 이동상으로는 0.1%(v/v) TFA(trifluoroacetic acid) 수용액을 사용하며, 유속
은 1mL/min이고, 검출은 파장 280 nm에서 자외선 검출기를 사용하였다(참조: 표
1).

【표 1】

<46> 베타-엔돌핀의 순수분리

정제과정	부피 (ml)	총단백질 (mg)	융합단백질 (mg)	베타-엔돌핀 (mg)	회수율 (%)	순도 (%)
배양액	50	515	232	20.3	100	3.9
음이온 교환수지	63	118.8	89.1	7.8	38.4	5.9
RP-HPLC	12	2.8	-	2.8	13.8	>99

<47> 상기 표 1에서 보듯이, HPLC처리된 시료를 전기영동한 결과, 베타-엔돌핀
2.8mg이 순수분리되었음을 알 수 있었다. 정제된 베타-엔돌핀의 N-말단 아미노산
서열을 분석한 결과, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys로서 이는 베타-엔돌핀
의 N-말단과 일치함을 확인하였다.

【발명의 효과】

<48> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 대장균에서 OmpF 단백질을
코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 전기 발현벡터에 의해 형질전환된 대장

균 및 그를 이용하여 목적 단백질을 대장균 세포외로 분비생산하는 방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 발현백터는 옴피실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함한다. 본 발명에 의하면, OmpF 자체 프로모터를 이용한 항시적 발현을 통하여 세포가 성장하면서 OmpF 융합 단백질의 분비 생산이 시작되고, 세포 농도가 높아짐에 따라 분비생산되는 양이 함께 꾸준히 증가하는 방식으로 종래에 비하여 간단한 방법으로 목적 단백질을 세포외로 분비생산할 수 있으므로, 고농도 세포배양을 통하여 단백질을 대량생산할 수 있다.

<49>

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

엠펙실린 저항유전자, OmpF 프로모터 및 OmpF 유전자를 포함하고, 도 2의 유전자 지도를 가지는 발현벡터 pOmpF6.

【청구항 2】

제 1항의 발현벡터 pOmpF6로 형질전환된 대장균 BL101/pOmpF6(*Escherichia coli* BL101/pOmpF6)(KCTC 1026BP).

【청구항 3】

(i) 제 1항의 발현벡터 pOmpF6에 단백질 분해효소의 인식 및 절단부위를 발현시키는 올리고펩타이드(oligopeptide) 및 목적 단백질 유전자를 도입시켜서, 목적 단백질을 세포외로 분비생산하는 재조합 발현벡터를 작제하는 공정;

(ii) 전기 재조합 발현벡터를 OmpF 유전자가 결실된 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 공정;

(iii) 전기 형질전환체를 배양하여, 배양액으로 부터 OmpF-융합단백질을 수득하는 공정; 및,

(iv) 전기 융합단백질에 단백질 분해효소를 처리하여, 목적 단백질을 회수하는 공정을 포함하는, 발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

단백질 분해효소는 팩터 Xa(Factor Xa), 엔테로키나제, 게네나제,
IgA 프로테아제, 인테인, 트롬빈, 트립신, 펩신, 서브틸리신 또는
플라스민인 것을 특징으로 하는

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【청구항 5】

제 3항에 있어서,

목적 단백질은 OmpF와 융합 가능한 펩타이드, 효소 또는 항체인 것을
특징으로 하는

발현벡터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【청구항 6】

제 3항에 있어서,

목적 단백질은 베타-엔돌핀인 것을 특징으로 하는

발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【청구항 7】

제 3항에 있어서,

재조합 발현백터는 pOmpF6 β E인 것을 특징으로 하는

발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【청구항 8】

제 3항에 있어서,

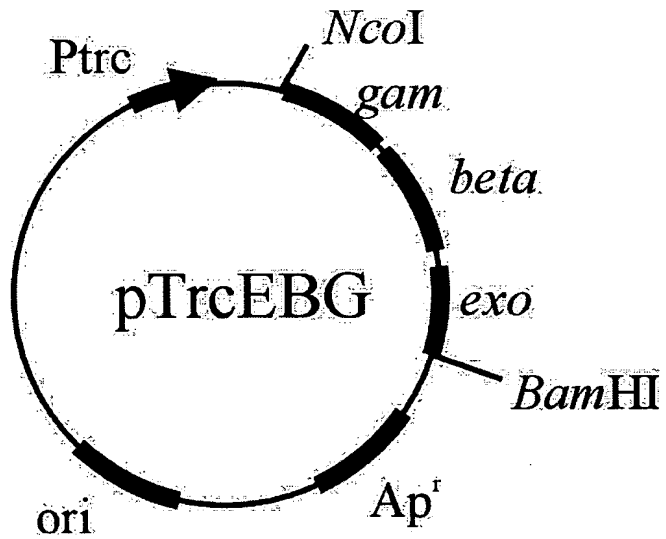
숙주세포는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물 또는

살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물인 것을 특징으로 하는

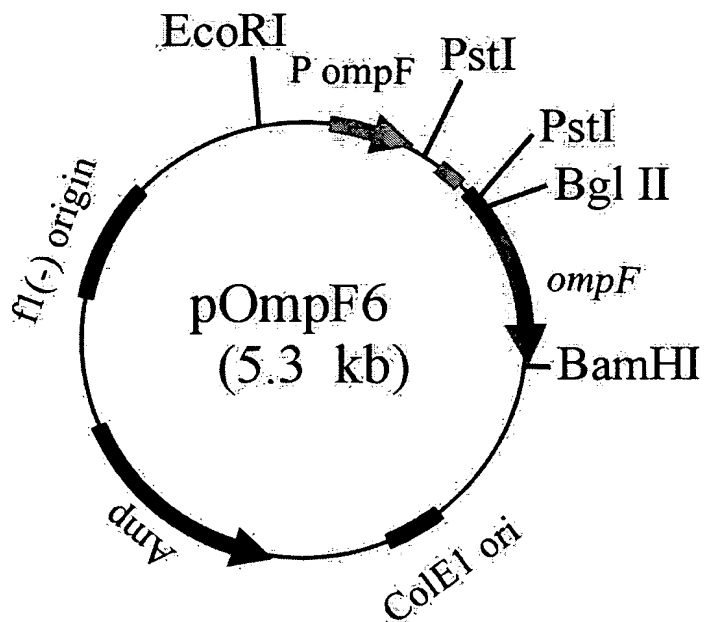
발현백터 pOmpF6를 이용한 목적 단백질의 분비생산방법.

【도면】

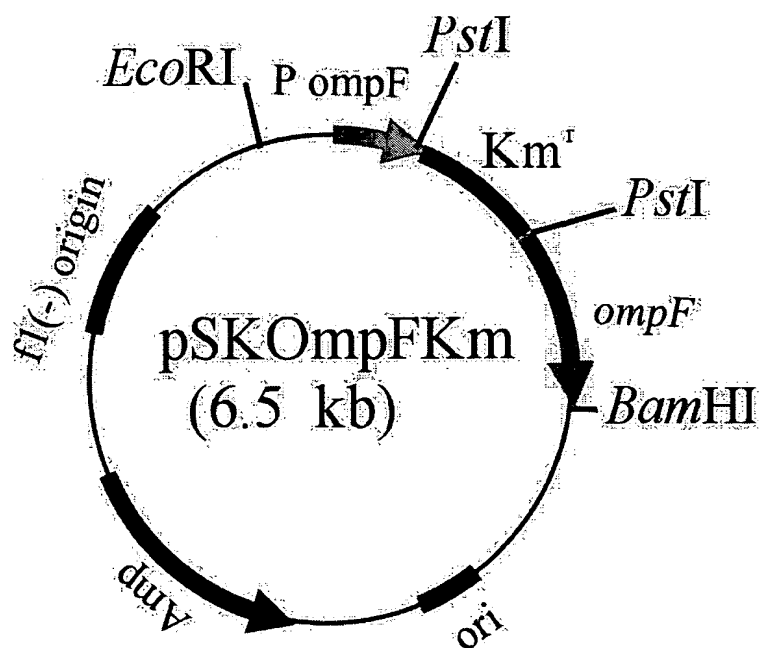
【도 1】



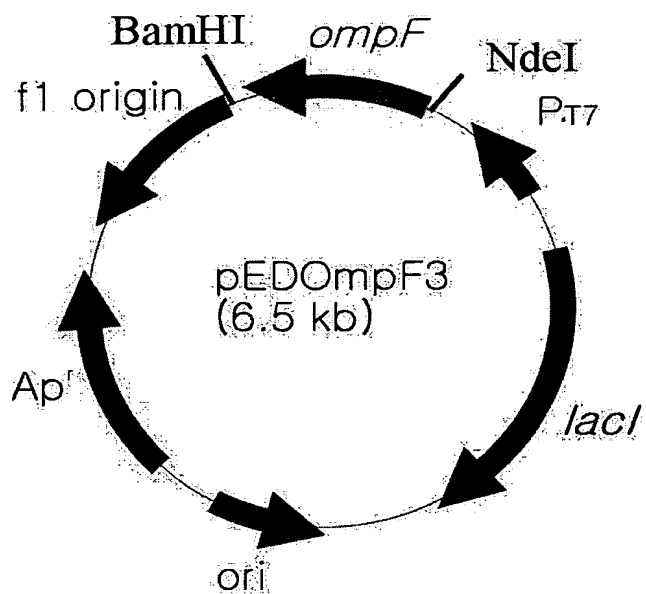
【도 2】



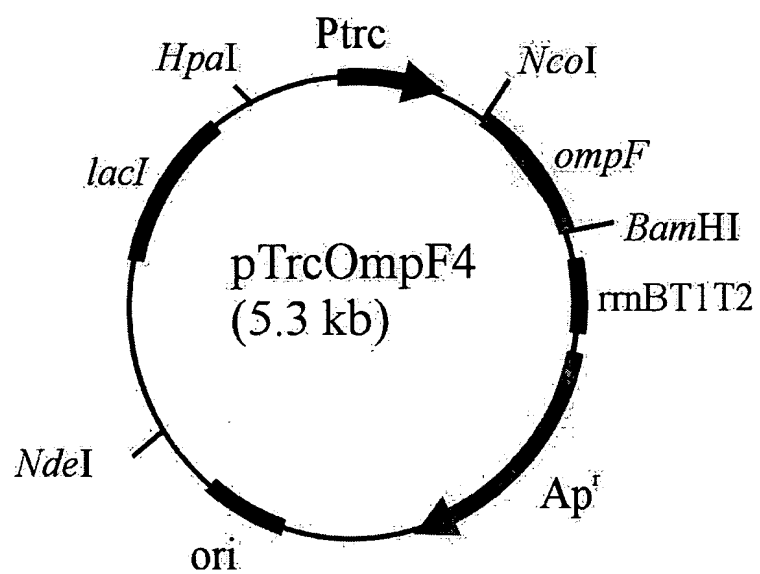
【도 3】



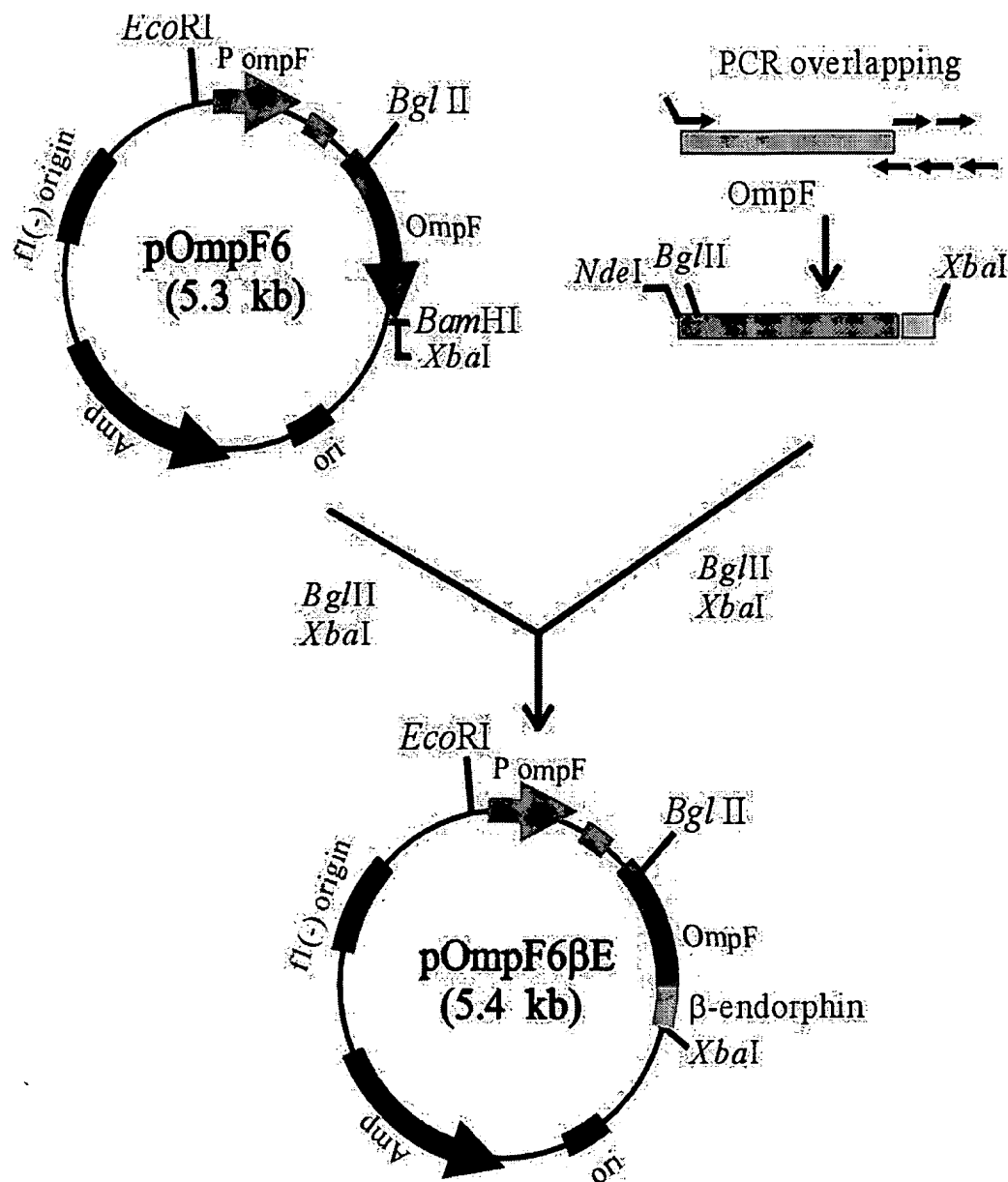
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【서열목록】

<120> A Method for Extracellular Producing Target Proteins Employing
OmpF in E. coli

<130> DP10655

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cgcgccatgg atattaatac tgaaactgag atcaagc

37

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

cgggatcctc atcgccattg ctccccaat ac

32

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

cggaattctg gattataccg acgcag

26

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gcggatcctt agaactggta aacgatac

28

<210> 5

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 5
 cgctgcagtt agaaaaactc atcgagcatc 30
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 6
 gcctgcaggc cacgttgtgt cctcaaa 27
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 7
 ccacagcaac ggtgtcgtct g 21
 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 8
 gatcggaatt gatttgagtt tcc 23
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer

<400> 9
 atctttatct ttgtagcact ttcac 25
 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 10
 gcgaattcat atgatgaagc gcaatattct g 31
 <210> 11
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 11
 gcgaattcca tggtagcgc caatattctg gcag 34
 <210> 12
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 12
 accgccatac cttccctcga tgaactggta aacgata 37
 <210> 13
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 13
 ggaaggatatg gcggtttcat gaccagcgaa aaaagccaga c 41
 <210> 14
 <211> 44
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 14

cgcggttttta aacagggtca ccagcggggt ctggcttttt tcgc 44

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 15

ccctgttttaa aaacgcgatc atcaaaaacg cgtataaaaa ag 42

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

gcggatccct attattcgcc tttttatatac gcgtttttg 39

<210> 17

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fusion Protein

<400> 17

Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr

1 5 10 15

Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu

20 25 30

<210> 18

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fusion protein cDNA

<400> 18

tatggcgggtt tcatgaccag cgaaaaaagc cagaccccgc tggtagacct gtttaaaac

60

gcatcatca aaaacgcgta taaaaaaggc gaataa

96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.